愈伤组织切割法快速繁殖安祖花研究

刘石泉[1], 徐　玲[1], 钟桐生[1], 邓中日[1], 周根余[2]

(1. 湖南城市学院化学与环境工程系, 益阳 413000; 2. 上海师范大学生命与环境科学学院生物系, 200234)

摘　要: 研究了安祖花茎尖于 MS+6-BA1.0mg/L+IBA0.1mg/L 中诱导的愈伤在不切割、切割成片状及糊状三种不同的方式下对其增重倍率、芽分化率的影响, 同时研究了蔗糖和 IBA 浓度诱导芽生根的影响。结果表明: 切割成片状的愈伤组织其增殖倍率、芽分化率明显优于其它两种方式; 诱导出来的芽在 1/2MS+IBA0.5mg/L 中附加 5%的蔗糖最有利于根的分化。

关键词: 安祖花; 愈伤切割方式; 芽分化; 根分化

中图分类号: S 682.1+4; S 604+.3　文献标识码: B　文章编号: 1001-0009(2007)05-0185-04

安祖花(*Anthuium andraeanum*), 又名红掌、灯台花、花烛、大叶花烛、水晶花烛、观叶花烛、火鹤等, 为天南星科红掌属, 原产中南美洲的热带雨林[1], 为多年生常绿草本植物, 其花序为肉穗花序, 具红色、粉红色、白色及五彩色的蜡纸佛焰苞, 是一种观花观叶两者兼宜的观赏花卉, 花朵鲜艳夺目, 是热带观花类的代表; 叶片有天鹅绒的金属光泽, 又是相当珍贵的观叶植物。安祖花的繁殖一般以分株繁殖为主, 偶尔也用扦插等方法繁殖, 但速度很慢[3], 目前国外主要是用组织培养法进行繁殖[4,5], 国内的种苗也主要是来自国外的组培苗, 为了满足安祖花的市场需求, 国内许多学者对其快繁进行了大量的研究[6~8]。研究在此基础上, 力求通过最简便、最稳定的组培快繁增殖方法, 为实现大规模工厂化生产奠定基础。除此之外, 该快繁体系的建立为农杆菌介导的基因转化[9,10]提供了前提条件, 如抗病、抗虫、改变叶色花色[12]等基因的转化有可能成为现实。

1　材料

安祖花来自本室组培苗, 接种于 MS+6-BA1.0(mg/L 单位下同)+IBA0.1 培养基中, 培养条件均为温度 24℃~26℃, 光照强度 40μmol/m²/s、12h/12h 光暗交替, 45d 继代一次。

2　试验方法

2.1　愈伤组织获得

切取带一对叶的安祖花茎尖, 在 MS+6-BA1.0+IBA0.1 上诱导愈伤, 45d 后供实验用。

2.2　愈伤组织不同切割方式对其增殖和芽分化的影响

挑选大小一致的愈伤组织, 切掉表层已分化的部分, 分不切割、切割成 0.5cm×0.5cm×0.1cm 大小的片状、切割成糊状三种情况, 分别接种于 MS+6-BA1.0+IBA0.1 中, 培养 45d 后统计其愈伤组织的增重和芽的分化数(实验重复 3 次)。

2.3　IBA 对根分化的影响

切取 2.2 中大小一致的芽(带三片叶)接种于 1/2MS+IBA(0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0)中, 蔗糖浓度为 3%, 每个梯度每次接种 10 棵芽, 培养 45d 后统计结果(重复 3 次)。

2.4　蔗糖对根分化的影响

切取 2.2 中大小一致的芽接种于 1/2MS+IBA0.5 中, 改变蔗糖浓度(0%、1%、3%、5%、7%), 每个梯度每次接种 10 棵芽, 培养 45d 后统计结果(重复 3 次)。

2.5　生根苗的移栽

将在 2.4 中生根苗揭开覆膜纸, 放于组培外环境下(同 1)3d 后, 洗净根部残留琼脂, 移到含水苔为基质的花盆中, 覆上保鲜膜室内环境 7d 后揭去保鲜膜, 移出室外, 一个月后统计其成活率。

3　结果与讨论

3.1　愈伤组织不同切割方式对其增殖和芽分化的影响

对愈伤组织只切割表层, 不再分割培养, 7d 后表层开始膨大, 颜色浅绿色, 约 14d 后有的分化成芽, 芽基部局部带红色; 切割成糊状的愈伤组织出现膨大的时间稍后, 约 10d 后才开始发生, 而且有部分糊状愈伤组织出现褐化进而死亡, 约 20d 后出现芽点, 芽基部局部带红色, 但芽发生的数目较少; 切割分成 0.5cm×0.5cm×0.1cm 片状大小的愈伤组织, 表层出现突起的时间最短, 约 5d 左右即可见, 10d 左右也可以见到局部带红色的芽, 愈伤组织从外表上看, 较前两种方式发生的要致密一些, 绿色也浓厚一些, 而且芽发生的数目特别多, 从表 1、图 1 和图 2 看, 愈伤组织增重和芽分化率明显优于其它两种方式, 切割成糊状的愈伤则最差, 大部分愈伤组织容易死亡。这一结果与杨涛[11]、周根余[12]等观察的

第一作者简介: 刘石泉(1969-), 男, 副教授, 硕士, 研究方向为植物遗传, E-mail: lsq205@tom.com。

基金项目: 湖南省高等学校科学研究资助项目(06C218)。

收稿日期: 2007-01-10

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

 北方园艺 2007(5):185~188

安祖花愈伤组织的诱导和分化结果是一致的。从不切割和切割成片状的表面愈伤组织的发生和分化情况来看，认为从愈伤组织发生的不定芽是近表层分生细胞团产生的，为外起源，切割表层后，愈伤组织中更多的分生细胞暴露于表层，有利于细胞的分裂和芽的分化，至于切成糊状的愈伤，若按相对表面积大小来看，增重和芽的分化应为最高，但试验结果却不佳，尤其是愈伤组织的增重最差。可能有三个方面的原因：一是被切割的愈伤组织来源于同一块愈伤组织的不同部位，很显然位于表层、中层、内层和中心位置的组织细胞的分裂和分化能力是不一样的；二是愈伤组织细胞的分裂和分化同样具有一定的群体效应，当愈伤组织块小到一定程度时，由于细胞间的相互作用消失或减弱而不利于其分裂或分化；三是由于切割时大量的愈伤组织细胞受损，亦或由于大量细胞损伤使分生细胞外环境发生改变，抑制其正常的分裂和分化。同样是切割，但结果却截然不同，最有可能的是第一种，我们对同块愈伤组织不同部位进行在同样培养条件下诱导，结果证实了我们的分析，表层确实易于分化，不易死亡，越往里面越差，中心部位效果最差，大部分死亡。

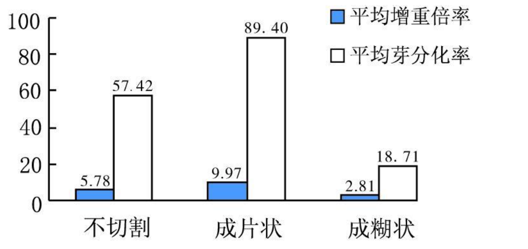

图1　切割方式对安祖花愈伤增重倍率和芽分化率的影响

表1　安祖花愈伤组织不同切割方式对其增殖和芽分化的影响　(45d)

切割方式	实验批(次)	净重1(g)	净重2(g)	净增重(g)	增重倍率	平均增重倍率	芽分化数(个)	芽分化率(个/g)	平均芽分化率(个/g)
不切割	1-1	0.9590	5.9816	5.0226	5.2373	5.7758	53	55.2659	57.4212
		0.5963	4.1897	3.5934	6.0262		42	70.4344	
		0.8472	5.4979	4.6507	5.4895		50	59.0179	
	2-1	0.8310	5.5835	4.7525	5.7190		56	67.3887	
		0.9511	6.0654	5.1143	5.3772		43	45.2108	
		0.8468	6.4600	5.6132	6.6287		41	48.4176	
	3-1	0.7902	5.0056	4.2154	5.3346		48	60.7441	
		0.9179	6.3749	5.4570	5.9451		39	42.4883	
		0.6340	4.5804	3.9464	6.2246		43	67.8233	
成片状	1-2	0.8667	10.0637	9.1970	10.6115	9.9686	71	81.9199	89.3998
		0.7825	8.6667	7.8842	10.0757		69	88.1789	
		0.9769	10.4561	9.4792	9.7033		73	74.7262	
	2-2	0.5849	6.4967	5.9118	10.1074		69	117.969	
		0.6122	6.9983	6.3861	10.4314		66	107.808	
		0.7986	8.0229	7.2243	9.0462		71	88.9056	
	3-2	0.9215	9.9299	9.0084	9.7758		74	80.3039	
		0.8195	8.6210	7.8015	9.5198		66	80.5369	
		0.7003	8.0159	7.3156	10.4464		59	84.2496	
成糊状	1-3	0.7232	3.2715	2.5483	3.5236	2.8121	15	20.7412	18.7134
		0.7701	3.3208	2.5507	3.3122		10	12.9853	
		0.8008	3.4971	2.6963	3.3670		8	9.9900	
	2-3	0.5912	2.8415	2.2503	3.8063		13	21.9892	
		0.7020	2.6731	1.9711	2.8078		16	22.7920	
		0.9393	3.0905	2.1512	2.2902		20	21.2925	
	3-3	0.8684	3.2978	2.4294	2.7976		23	26.4855	
		0.7562	3.3285	2.5723	3.4016		11	14.5464	
		0.9660	3.4148	2.4488	2.5350		17	17.5983	

左－不切割；中－切割成片状；右－切割成糊状

图2　切割方式对安祖花愈伤增重倍率和芽分化率的影响

3.2　IBA对根分化的影响

人们对安祖花生根的研究比较多，但大多数都集中在添加不同种类的植物生长调节剂及无机盐的浓度这两个方面，其结果较为一致的表明：添加1/2MS的无机盐有利于生根，添加适当浓度的IBA、NAA等均能诱导生根，但许多报道中，对这两种激素的浓度并未加以更具体细致的研究，而且所用培养基也较复杂，并且培养基之间也没有很好的连续性；NAA激素的使用还存在很大的问题，高浓度的NAA可强烈诱导愈伤，对植株的遗传稳定不利，有些文献上也报道使用NAA后，安祖花

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

生根部分向上生长[13]。故试验希望延续前期试验,在MS＋6－BA1.0＋IBA0.1上诱导出芽的基础上,用1/2MS和不同浓度梯度的IBA寻求最快、最简便有效的方法使安祖花芽生根,为以后的大规模栽种打下基础。

从表2、图3和图4可知:在不添加激素的培养基上生根最快,一周即有根发生,但根细弱,数量少,生长慢;随着激素浓度升高,根发生时间也随之延长,尤其当IBA浓度达到2.4时,根不仅很难发生,而且极易愈伤化,根尖膨大、发黄,部分向上生长;在生根效率无很大差别的低浓度培养基上,我们选择0.5为最适浓度,在低浓度下,根发生快,长势好,根的形态也正常。

3.3 蔗糖对根分化的影响

文献检索未见有蔗糖对安祖花生根影响的系统报道,表3、图5和图6表明:在没有碳源加入的培养基中,安祖花根发生迟缓,生长势很弱,植株相当矮小,随着蔗糖浓度的提高,生长势和生根情况逐渐有所好转,当达到浓度为5%时,生根效率最高,发生时间也最快,但浓度过高,如达到7%时,根的生长反而受到抑制,根变得又粗又短,而且还略带黄色、红色,并且有些根向生长,说明适当浓度的蔗糖对根的发生有利。

表2　IBA对根分化的影响　(45d)

浓度 (mg/L)	接种芽数 (棵)	总根数 (条)	平均根数 (条)	平均根长 (cm)	平均根径 (mm)	生长方向 (上/下)	发生时间 (d)	生根效率
0.0	30	82	2.73	1.7	1.1	下	8	5.11
0.5	30	153	5.10	1.5	1.3	下	10	9.95
1.0	30	184	6.13	1.2	1.2	下	10	9.57
1.5	30	197	6.57	0.8	1.3	下	15	6.83
2.0	30	218	7.27	0.6	1.4	部分上	20	6.10
4.0	30	251	8.37	0.3	1.6	部分上	25	4.02

注:生根效率＝平均根数×平均根长×平均根径

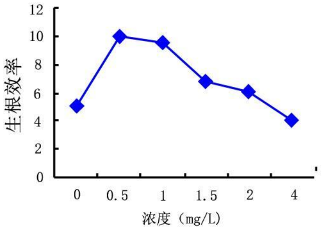

图3　IBA浓度对根分化的影响

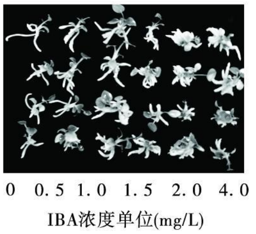

图4　IBA浓度对根分化的影响

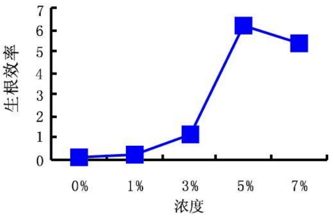

图5　蔗糖浓度对根分化的影响

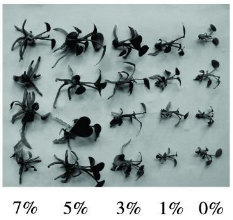

图6　蔗糖浓度对根分化的影响

蔗糖在组织培养中一方面作为碳源和能源,另一方面又具有调节渗透压的作用。低浓度的蔗糖不足以供给组织足够的营养,而高浓度时,高渗溶液引起细胞失水,长期培养会对细胞产生伤害,影响水分的吸收[14],从而抑制根的生长。周根余[2]等对安祖花在不同蔗糖浓度下形成的不定芽可溶性糖含量进行测定也证实了这一点。试验中芽在高浓度的蔗糖中培养45d后,根的数目较为正常,只是后期变得粗短,说明刚开始时并不抑制其根的发生,但对其后来生长却有较大影响。

表3　蔗糖对根分化的影响　(45d)

浓度 (%)	接种芽数 (棵)	总根数 (条)	平均根数 (条)	平均根长 (cm)	平均根径 (mm)	生长方向 (上/下)	发生时间 (d)	左右 生根效率
0	30	23	0.77	0.28	0.56	下	35	0.12
1	30	36	1.21	0.32	0.74	下	20	0.28
3	30	79	2.63	0.56	0.81	下	20	1.19
5	30	147	4.93	1.48	0.86	下	15	6.24
7	30	135	4.54	1.16	1.02	部分上	20	5.32

注:生根效率＝平均根数×平均根长×平均根径

3.4 室外移栽

室外移栽苗一个月后,其成活率为100%,全部成活。

4 结论

根据试验,通过愈伤组织可以在同一个培养基上增殖和出芽,在短时期内就能迅速大量繁殖:一个安祖花顶芽通过愈伤组织切割成片状在MS＋6－BA1.0＋IBA0.1上诱导90d可以形成约90个芽,在1/2MS＋IBA0.5上诱导45d生根练苗即可移栽,繁殖倍率相当大,因而能够满足市场的动态需求。而且该方法愈伤的诱导、增殖、出芽均在同种培养基上完成,只有在有市场需求时才接入诱导生根培养、练苗程序,简化了操作,便于规范管理。

参考文献:

[1]　穆鼎.鲜切花周年生产[M].北京:中国农业科技出版社,1997,183-192.

[2]　洪惠泽.火鹤鸟的观赏和栽培[J].花木盆景,1995,2:10.

[3]　北京市花卉研究所.室内花卉——新引进的国外观叶植物[M].北京:中国经济出版社,1989,128-130.

[4]　Pierik R L M. Callus multiplication of Anthuium andraeanum Lind. in liquid media[J]. Neth J. Agric. Sci, 1975,23(4):299-302.

[5]　Pierik R L M. Anthuium plantlets from callus tissues cultivated in vitro[J]. Physiol. Plant, 1976, 37(1):80-82.

[6]　毛荣森,张启明,莫汗坤.花烛的组织培养[J].植物生理学通讯,1991,27(6):43.

[7]　岑益群,蒋如敏,邓志龙,等.安祖花离体增殖形态发生与理化因子效应[J].园艺学报,1993,20(2):187-192.

[8]　高遐虹,李梅.安祖花叶片的离体培养[J].北京农学院学报,1995,9(2):35-38.

[9]　Chen F C, Kuehnle A R, Sugii N. Anthurium root for micropropagation and Agrobatorrium tumefactiens-mediated gene transfer[J]. Plant cell tissue organ cult, 1997, 49(1):71-74.

[10]　贾永芳,李名扬.安祖花研究进展[M].江苏:江苏林业科技,2002,29(4):43-45.

[11]　杨涛,陈德海,吴荔平.安祖花组织培养及其叶绿体发育过程的电镜观察[J].亚热带植物通讯,1998,27(1):1-7.

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

PP_{333}、B_9、CCC 对越橘试管苗生长的影响

蒋小满,赵建萍,柏新富,丁洁

(鲁东大学生命科学学院,山东烟台 264025)

摘　要:以 WPM + ZT2.0mg/L 为基本培养基,添加不同种类和浓度的 PP_{333}、B_9、CCC,比较其对越橘试管苗生长的影响,结果表明:PP_{333}、B_9、CCC 3 种生长延缓剂中,10~40mg/L 的 B9 和 10~80mg/L 的 CCC 对越橘试管苗具有延缓生长的作用,由此长成的小苗健壮,茎粗叶茂,生根率高。而越橘试管苗对PP333 极为敏感,在极低浓度下(0.05mg/L)仍对越桔试管苗的生长产生强烈抑制,并使试管苗生长畸形。

关键词:越橘试管苗;PP_{333};B_9;CCC;复壮

中图分类号:S666.903.6　文献标识码:A　文章编号:1001-0009(2007)05-0188-03

越橘,又称蓝莓,属于杜鹃花科越橘属灌木,原产北美,是 20 世纪中后期发展起来经济价值很高的新兴优良果树[1,2]。越橘果实具有极高的食用和药用价值,被国际粮农组织列为五大健康食品之一[3,4]。

我国具有较丰富的野生越橘资源,但野生越橘品种产量太低、栽种品质差,需要经过品种改良才能应用于果树生产[5]。关于越橘品种改良工作国内研究得较少,而欧美国家早在20 世纪 30 年代就开始对越橘进行品种改良,目前已获得大量适于大面积栽培优良栽培品种。为解决国内越橘栽培品种短缺的局面,我国陆续从国外引进了一些越橘优良品种[6]。越橘主要采用枝条扦插,根条繁殖等方式进行繁殖[7]。但在引种初期,采用扦插繁殖周期长、繁殖率低。应用组培技术则可在短时间内得到大量组培苗[8]。但越橘组培苗植株纤弱、生根率很低,如直接进行扦插或移栽成活率难以保证。因此,有必要对越橘组培苗进行壮苗研究。本实验采用多效唑(PP_{333})、比久(B_9)、矮壮素(CCC) 3 种生长延缓剂处理越桔试管苗,研究其对越桔试管苗生长的影响。

1　材料与方法

1.1　试验材料

供试材料为鲁东大学组培室提供的继代 8~10 代的越橘试管苗,品种为北高丛越橘和半高丛越橘。

1.2　培养基的配制

本研究所用基本培养基为 WPM 培养基[9]。越桔试管苗继代培养基为 WPM + ZT(玉米素) 2.0mg/L+蔗糖 30g/L+琼脂 6.0g/L。培养基 pH 值调节为 5.0。

第一作者简介:蒋小满(1964-),女,教授,硕士,主要从事植物生理学研究,E-mail:jiangxiaomam@163.com。

收稿日期:2007-01-10

[12] 周根余,苗秀莲,程磊.影响安祖花试管苗生长的若干因素[J].上海师范大学学报,1999,28(4):76-81.

[13] 王进茂,郑均宝,高秀丽.花烛组织培养的研究[J].河北果林研究,2000,15(1):69-74.

[14] 吕芝香,王曼丝,董建国.不同碳源对甘薯块根愈伤组织的形成和生长的影响[J].植物生理学报,1981,7(2):105-110.

Rapid Micropropagation *Anthuium andraeanum* by Cutting the Callus

LIU Shi-quan[1], XU Ling[1], ZHONG Tong-sheng[1], DENG Zhong-ri[1], ZHOU Gen-yu[2]

(1. Department of Chemistry and Environment Engineering, Hunan City University, Yiyang, 413000; 2. Genetics Laboratory, Department of Biology, College of Life and Environment Science, Shanghai Normal University, 200234)

Abstract: The increasing weightiness rates and bud differentiation rates were studied by cutting the *Anthuium andraeanum* callus. It was cut in three ways: uncut, cut into pieces and cut into mince on media MS+6-BA1.0mg/L+IBA0.1mg/L. The results showed that cutting the callus into pieces was much better than the other ways. And the effort for roots differentiation by different content of IBA and sucrose were also researched. The best medium for roots differentiation is 1/2MS+IBA0.5mg/L, adding 5% sucrose.

Key words: *Anthuium andraeanum*; Cut way of callus; Buds differentiation; Roots differentiation

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net